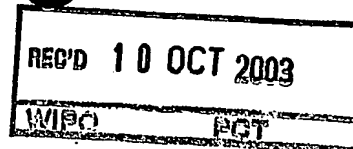


10/500245

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

10 Rec'd PGI/PTO 11:2 AUG 2004

| | | |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 YCT-770 | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO2/13858 | 国際出願日 (日.月.年) 27.12.02 | 優先日 (日.月.年) 28.12.01 |
| 国際特許分類(IPC) Int. C17 A61K38/40, 38/16, 9/14, 9/16, 9/20, 9/48, A61P1/16, 3/04, 3/06, 3/10, 9/12 | | |
| 出願人(氏名又は名称) 株式会社NRLファーマ | | |

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 20 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

| | | |
|---|----------------------------|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 19.02.03 | 国際予備審査報告を作成した日 24.09.03 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 富永 保 印 | 4C 3039 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 | | |

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 2-4, 16, 21 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 1, 5-15, 17-20 ページ、 05.09.03 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 4-7, 12-16, 20-26 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 1-3, 8-11, 17-19 項、 05.09.03 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1/14-14/14 ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 17-26

理由：

- ☒ この国際出願又は請求の範囲 17-26 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 17-26 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第34条(4)(a)(i)及びPCT規則67.1(iv)の規定により、この国際予備審査機関が国際予備審査を行うことを要しない対象に係るものである。

- ☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 17-26 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査を行うことができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ 磁気ディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|---------------|-------|-------------------------|---|
| 新規性(N) | 請求の範囲 | 1, 3-6, 8, 9, 11-14, 16 | 有 |
| | 請求の範囲 | 2, 7, 10, 15 | 無 |
| 進歩性(IS) | 請求の範囲 | 1, 3, 9, 11 | 有 |
| | 請求の範囲 | 2, 4-8, 10, 12-16 | 無 |
| 産業上の利用可能性(IA) | 請求の範囲 | 1-16 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1 : JP 2000-325046 A (明治乳業株式会社) 2000.11.28
 文献2 : JP 2001-048808 A (森永乳業株式会社) 2001.02.20
 文献3 : WO 00/22909 A2 (BIOTECH AUSTRALIA PTY.LIMITED) 2000.04.27
 文献4 : WO 91/04015 A1 (BUKH MEDITEC A/S) 1991.04.04
 文献5 : WO 98/44940 A1 (AGENNIX, INC.) 1998.10.15
 文献6 : EP 955058 A1 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) 1999.11.10

国勢調査報告で引用された上記文献1には、ラクトフェリンを有効成分とする肝疾患の予防、治療剤が記載されており(請求項1参照)、脂肪肝への適用も記載されている(【0011】段落参照)。

同文献2には、ラクトフェリンを他の成分と乾燥状態で混合し、その後打錠する工程を含有する、腸溶性糖衣錠の製造法が記載されている(第11欄実施例3参照)。

同文献3には、胃での分解を抑制し、腸内で吸収させるために、生物学的活性成分を腸溶性コーティングすることが記載されており(Abstract参照)、該生物学的活性成分として、ラクトフェリンを使用し得ることも示されている(Claim32参照)。

同文献4には、腸溶性コーティングを備えた組成物が記載されており(Claim45参照)、医薬としてラクトフェリンを使用し得ること(第15頁第20行参照)、及び、医薬が胃酸によって分解されることが好ましくない等の場合には、腸溶性コーティングが施されることが記載されている(第27頁第23~29行参照)。

同文献5には、ラクトフェリンを腸溶性コーティングし得ることが示されている(第17頁第16-17行参照)。

同文献6には、ラクトフェリンを他の成分と乾燥状態で混合し、その後打錠することによりラクトフェリン錠剤を製造する方法が記載されている(Test, Example参照)。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

○請求の範囲 2, 7, 10, 15

文献1には、ラクトフェリンを脂肪肝の治療に使用することが記載されており、請求の範囲 2, 7, 10, 15 に記載された発明は、上記文献1に対して新規性、及び進歩性を有さない。

なお出願人は、2003.09.05付け答弁書において、上記文献1においては、脂肪肝への適用は記載のみでデータが示されておらず、脂肪肝の病因は複雑であることから、単なる肝障害抑制作用から脂肪肝全般への適用が可能であるというのは理論的根拠に乏しく、本願発明が新規性、進歩性を有する旨主張している。

しかしながら文献1には、ラクトフェリンが肝障害抑制作用、及び、TNF α 産生抑制作用を示すことが記載されており、ラクトフェリンがこのような作用を有することは、肝機能低下が原因となる脂肪肝に対して、ラクトフェリンを適用可能であることの理論的根拠に相当すると認められる。

そして、本願上記請求の範囲に係る発明においては、当然、肝機能低下が原因となる脂肪肝を処置するための組成物も包含されるので、この点で本願上記請求の範囲に係る発明と文献1に記載の発明が相違するものとは認められず、出願人の上記主張を採用できない。

○請求の範囲 4, 8, 12, 16

請求の範囲 4, 8, 12, 16 に記載された発明は、上記文献1-6に記載されておらず、新規性を有する。

文献2, 6に記載されているように、ラクトフェリンを他の成分と乾燥状態で混合し、その後打錠することにより錠剤を製造することは公知の技術的事項であり、文献1に記載の発明において、この製造方法を採用することは、当業者が適宜なし得た事項と認められる。

そして、それにより格別な効果が奏されることも認められない。

したがって、請求の範囲 4, 8, 12, 16 に記載された発明は、上記文献1, 2, 6に対して進歩性を有さない。

○請求の範囲 5, 6, 13, 14

請求の範囲 5, 6, 13, 14 に記載された発明は、上記文献1-6に記載されておらず、新規性を有する。

文献2-5に記載されているように、ラクトフェリンを有効成分とする医薬に対して腸溶性コーティングを施すことは通常行われることである。よって、文献1に記載の発明において、腸溶性コーティングを施すことは、当業者が適宜なし得た事項と認められる。

そして、それにより格別な効果が奏されることも認められない。

したがって、請求の範囲 5, 6, 13, 14 に記載された発明は、上記文献1-5に対して進歩性を有さない。

○請求の範囲 1, 3, 9, 11

請求の範囲 1, 3, 9, 11 に記載された発明は、上記文献1-6に記載も示唆もされておらず、新規性、及び進歩性を有する。

明 細 書

脂質代謝改善用組成物

5 技術分野

本発明は、ラクトフェリンを含む、医薬組成物に関する。本発明の組成物は、脂質代謝改善剤として用いることができる。詳細には、本発明の組成物は、高コレステロール血症、高中性脂肪血症、高低比重リポタンパク（LDL）コレステロール血症、低高比重リポタンパク（HDL）コレステロール血症、肥満、脂肪肝およびコレステロール胆石症を処置するため、また、高度肥満、高脂血症、高血圧症、II型糖尿病などの生活習慣病の処置するために有用である。本発明の組成物は、基礎代謝量を向上させうる。

背景技術

15 現代は飽食の時代である。それにともなって肥満が克服しなければならない健康上の重要課題として浮上してきた。米国では小学校児童の約30%が、標準体重を30%以上超えた肥満児とされている。さまざまな疫学調査で明らかのように、学齢期の肥満は、その大部分は成人に達した後も進行する。それとともに、三十才後半からの中年の加齢期に標準体重を30%以上超過する肥満者が続出する
20 のので、合計すると欧米における肥満人口は、人類が経験したことのない大きな割合を占めるに至った。欧米ほど顕著ではないが、我が国でも運動不足と飽食による肥満児の増加が大きな問題となってきた。

云うまでもなく肥満は、虚血性心疾患、本態性高血圧症、II型糖尿病、ある
25 種のガンを発症させる重要な危険因子であり、高度肥満の低年齢化は、生活習慣病の激増を予告している。また、脂肪肝およびコレステロール胆石症も、肥満および脂質代謝異常を背景とする看過できない疾患である。肥満は生活習慣病の発症を促進するだけでなく、活動を不活発にさせ、社会生活への適応を心理的に難しくする。従って、肥満は経済的および社会的に大きな損失である。肥満者が激

いる ϵ -ポリリジン（特開平 4-221320）、プロタミン、ヒストン、ポリ-L-アルギニン（特開平 3-284627）などの塩基性タンパク質あるいは塩基性ペプチドは、*in vitro* で膵リパーゼ活性を阻害し、消化管において脂肪の吸収を阻害する効果を示す。

5

いずれの方法で脂肪の消化管吸収を阻害するにせよ、これらの方法は、それ自身に内包する欠点から免れることは難しい。欠点とは、小腸における消化吸収を免れた中性脂肪が、大量に大腸に流入することである。哺乳類の消化管には多種多様の腸内細菌が生息しており、ヒトの場合には百種を越える腸内細菌が 150

- 10 兆個も大腸に生活していると算定されている。大腸に生息する腸内細菌は、小腸における消化過程で消化できなかった食物残渣、あるいは消化吸収を免れたごく少量の栄養物に依存して生活している。つまり、大腸は栄養の供給が乏しい環境であり、貧弱な栄養環境に適応した微生物が生活している。しかも、重要なことは、それらの腸内細菌が宿主と共生関係にあり、大腸が機能を発揮するうえで必須の酪酸を始めとする低級脂肪酸を産生し宿主に供給していることである。しかし、脂肪の吸収が阻害され大腸が栄養的に豊かな環境に変化すると、富栄養化した環境に適応した微生物が爆発的に増殖し、健康維持に必要なビフィズス菌、乳酸菌などを圧倒して増殖する可能性が排除できない。オルリスタットを投与した際に認められた下痢、ガス発生、腹部膨満などの副作用は、大腸における腸内細菌叢の変化を反映しているのである。
- 15
- 20

発明の開示

本発明者らは牛乳から得られるラクトフェリンを製剤化し、健常者ならびに病者に経口投与したところ、脂質代謝が急速かつ有意に改善されることを見いだした。すなわち、ラクトフェリン腸溶製剤を健常者、病者に投与すると、統計的な有意差で、血中コレステロール値と同中性脂肪値の低下、血中 HDL コレステロール値の上昇および同 LDL コレステロール値の低下が起り、本態性高血圧症、II 型糖尿病などの病態改善が随伴するのである。すなわち、臨床的な脂質代謝改善作用は明らかである。

25

また、高脂肪飼料を供与した齧歯類動物を使ってラクトフェリンによる脂質代謝改善作用を検討したところ、ヒトの場合と同様の血中脂質の変化に加え、肝臓におけるコレステロールおよび中性脂肪がラクトフェリン投与により有意に減少

5 することを発見した。つまり、ラクトフェリンはヒトおよび齧歯類動物で食事性コレステロールならびに中性脂肪の消化管吸収を阻害することにより、肝臓における脂質蓄積を抑制し、血中脂質のプロファイルを改善させる作用があることが判明したのである。

- 10 ラクトフェリンはヒトに経口投与すると、ビフィズス菌を増加させる効果が確認されている（川瀬ら、酪農科学・食品の研究、45 巻 A75-81, 1996 年）。ラクトフェリンをヒトに経口投与しても、脂肪吸収阻害物質で見られる下痢、ガス発生、腹部膨満感などの副作用はほとんど認められなかった。つまり、ラクトフェリン群タンパク質は、小腸における消化吸收を免れた脂肪が大腸に流入しても、
- 15 ビフィズス菌などの有用腸内細菌を増殖させるので、腸内細菌の菌交代にともなう弊害が起こり難い利点を有しているといえる。このようなことからラクトフェリン群タンパク質は長期にわたり連用可能であると考えられた。

このような知見に基づき、本発明者らは、ラクトフェリン

を有効成分とする、脂質代謝改善用組成物、高コレステロール血症、高中性脂肪血症、高低比重リポタンパク（LDL）コレステロール血症、低高比重リポタンパク（HDL）コレステロール血症、肥満、脂肪肝およびコレステロール胆石症からなる群より選択される少なくとも一つの疾患または状態を処置するための組成物を完成させた。本発明の組成物は、高度肥満、高脂血症、高血圧症、II 型糖尿病などの生活習慣病治療に有効である。

図面の簡単な説明

図 1 は、ラクトフェリン投与による ICR 系マウスの血液中のタンパク質濃度の上昇と、中性脂肪値および遊離脂肪酸値の低下とを示したグラフである（実施例 1）。16 頭の 3 週令の ICR 系雄性マウスを無作為に 2 群に分け、一方の群を対照として粉末飼料（日本クレア、CE-2）を与え、他方の群に 1% のラクトフェリンを添加した粉末飼料を与え 4 週間飼育した。4 周後に屠殺して採血し、血清総蛋白質、中性脂質、遊離脂肪酸を定量した。

左側の格子バーは対照群、右側の点線バーはラクトフェリン群である。棒は標準偏差を示す（それぞれ $n=8$ ）。** $P<0.01$, in Student's t-test

図 2 は、図 1 と同じ実験においてラクトフェリン投与によるマウス血中コレステロールの変化を示したグラフである（実施例 1）。左側の格子バーは対照群、右側の点線バーはラクトフェリン群である。棒は標準偏差を示す（それぞれ $n=8$ ）。** $P<0.01$, in Student's t-test

図 3 は、図 1 と同じ実験においてマウス血中の HDL コレステロール値／総コレステロール値の比を示したグラフである（実施例 1）。左側の格子バーは対照群、右側の点線バーはラクトフェリン群である。棒は標準偏差を示す（それぞれ $n=8$ ）。** $P<0.05$, in Student's t-test

図 4 は、図 1 と同じ実験においてラクトフェリンによる肝臓の脂質含量の変化を示したグラフである（実施例 2）。左側の格子バーは対照群、右側の点線バーはラクトフェリン群。棒は標準偏差を示す（それぞれ $n=8$ ）。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, in Student's t-test

図 5 は、ラクトフェリン腸溶錠のヒト・ボランティア中性脂肪値に与える効果を示したグラフで

ある（実施例 3）。●および○はラクトフェリン腸溶錠を内服した場合、×は内服しなかった場合を示す。

図 6 は、8 名の成人ボランティアにおけるラクトフェリン腸溶錠の総コレステロール値に与える効果を示したグラフである（実施例 4）。 $P < 0.01$ in

5 Student's paired t-test

図 7 は、成人ボランティアにおけるラクトフェリン腸溶錠のウエスト（胴囲）および体重に与える効果を示したグラフである。

図 8～11 は、ラクトフェリン腸溶錠の中性脂肪値および総コレステロール値に与える効果を示したグラフである（実施例 5～8）。

10 図 12 は、ラクトフェリン腸溶錠の中性脂肪値および総コレステロール値に与える効果を詳細に示したグラフである（実施例 9）。●は、飲酒した翌朝の中性脂肪の測定値を示す。

図 13A は、ラクトフェリン腸溶錠を経口投与した場合の血中のラクトフェリン濃度を示したグラフである（実施例 10）。

15 図 13B は、血中のラクトフェリン濃度を測定した際の、ラクトフェリン腸溶錠の投与タイミングおよび血液採取スケジュールを表した図である。

図 14A は、成人ボランティアのラクトフェリン服用群、図 14B は成人ボランティアのコントロール群について、起床時体温と昼食 1 時間後の体温とを測定した結果を示したグラフである（実施例 11）。

20

発明の詳細な説明

本発明の組成物は、ラクトフェリンを有効成分とする。本明細書でいう「ラクトフェリン」には、牛乳から抽出されるウシラクトフェリンおよび遺伝子工学によりつくられる遺伝子組換えラクトフェリンが含まれる。

25

本発明の組成物には、経口投与した場合に、脂質代謝改善作用、基礎代謝量向上作用を発揮する限り、いかなるラクトフェリンをも用いることができる。ラクトフェリンは分子

量が 8 万程度の高分子であり 2 個の 3 価鉄イオンとキレートをつくる性質があるが、本明細書でいう「ラクトフェリン」には、鉄イオンフリーの型から完全に鉄イオンが飽和された型の全てが含まれ、また由来を問わず、ヒト、ウシ、組み換え型等、あらゆるラクトフェリンが含まれる。

5

本発明の組成物は、ラクトフェリンの 1 種類のみを含んでいても、または 2 種類を含んでいてもよい。

10 本発明の組成物は経口投与されるものである。その形態は、医薬組成物であってもよく、食品、飲料、ドリンク剤の形態であってもよい。本発明の組成物は、経口投与に便利な剤形、例えば粉末剤、散剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル剤の形態であることが好ましい。

15 本発明の組成物を製剤化する際に用いる賦形剤としては、乳糖、蔗糖、グルコース、ソルビトール、ラクチトールなどの単糖ないし二糖類、コーンスターチ、ポテトスターチのような澱粉類、結晶セルロース、無機物としては軽質シリカゲル、合成珪酸アルミニウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウムなどがある。ただし、還元性の単糖類および二糖類は、有効成分のラクト
 20 フェリン群タンパク質（またはラクトフェリン群タンパク質の酵素分解物）の ϵ -アミノ基とアミノカルボニル反応をおこし、変性させるおそれがある。特に、水分や鉄イオンの存在下では、急速なアミノカルボニル反応が進行するおそれがある。

25 本発明の組成物を製剤化する際に用いる賦形剤としては、崩壊剤としては澱粉類、カルボキシメチルセルロース（CMC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、カルボキシメチルセルロース・ナトリウム塩、ポリビニルピロリドンなどがある。滑沢剤としては蔗糖脂肪酸エステル、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムなどを使用することができる

本発明の組成物は、単独で投与しても、他の薬剤と併用してもよい。また、本発明の組成物を食品や飼料中に添加して投与することもできる。

- 5 本発明の組成物は、乾燥状態で製剤化することが好ましい。代表的な本発明の組成物の有効成分であるラクトフェリンは、高温・多湿では不安定だからである。詳細には、ラクトフェリンのアミノ基と賦形剤等に存在する還元基との間ではアミノカルボニル反応が生じうる。これはさらに多段階を経て、不可逆的に反応物の重合による褐色色素の形成に至る（褐変反応）。酸化を触媒する物質の存在や、高温は、この反応を促進する。すなわち、ラクトフェリンを製剤化する際、
- 10 水が存在するとラクトフェリンに含まれる Fe^{3+} などの影響で、アミノカルボニル反応が促進されうる。また打錠による発熱もまた、この反応を一層促進する。よって、薬理効果の維持された安定なラクトフェリン製剤を得るためには、製剤化はできるだけ乾燥状態で行うのがよい。

ラクトフェリン粉末は通常、非常に比重が軽いためにそのまま打錠できないことから、より薬理効果の維持された安定な製剤である本発明の組成物を得るには、例えば、有効成分と賦形剤、結合剤、崩壊剤を混合し、混合物をスラグマシンで強圧成型し薄い大きな平たい円盤をつくり、それを砕いて篩過し、一定の大きさの顆粒をそろえる。そして錠剤とする場合には、顆粒に滑沢剤を加えて打錠し、錠剤を所望によりコーティング皮膜で覆って製品化するのがよい。また、カプセル剤とする場合には、顆粒の一定量をカプセルに充填して、カプセル剤とするのがよい。

15

- 本発明の組成物は、腸溶性の製剤とすることが好ましい。本発明者らは、先にした国際出願 PCT/JP01/10212 (WO02/41912) で詳述しているように、腸管粘膜上にはラクトフェリン・センサーともいえるべき構造が存在するとの仮説を有しており、他方、ラクトフェリンが、ペプシンに対して感受性は強いが他のプロテ
- 20 アーゼに対しては著しく抵抗性であるとの知見を有している。すなわち、腸管粘

膜上に作用部位が存在し、かつペプシンに対して高感受性であるラクトフェリンにおいては、腸溶性の製剤とすることに特に技術的意義を有する。

腸溶性とするには、胃液に対しては抵抗性があり、小腸内で溶解する基剤、例えばシェラック、ヒドロキシプロピルメチルセルロース・フタレート、カルボキシメチルエチルセルロース、酢酸フタル酸セルロース、メタクリル酸コポリマー、水に不溶のエチルセルロースおよびアミノアルキルメタアクリレートコポリマーからなる群より選択される基剤を主成分とする皮膜で、腸溶性のカプセルに有効成分を含む顆粒を充填するか、または有効成分を含む顆粒に滑沢剤を加えて打錠して得た錠剤をコーティングするとよい。

特に本発明者らは、ラクトフェリンを内服した者の血液中に、ラクトフェリンを確認した。このような知見は既存のラクトフェリン製剤では得られてこなかった。ラクトフェリンを有効成分とする腸溶性製剤の形態であるものは、本発明の好ましい実施態様の一つである。さらに、乾燥状態で製剤化され、かつラクトフェリンを有効成分とする腸溶性製剤の形態であるものは、本発明の特に好ましい実施態様の一つである。

ラクトフェリン腸溶錠の投与および血液採取は、次のスケジュールで行った。すなわち、7:00 に朝食を採った後、9:30 少し前にラクトフェリン投与前の血液採取し（Pre サンプル）、9:30 にラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）を投与した後、13:30 および 17:30 に血液採取した（それぞれ、4hr および 8hr サンプル）（図 12B）。

製造された組成物が、腸溶性であるか否かは、塩化ナトリウム 2.0g に希塩酸 24ml 及び水を加えて溶かし、1000ml とした第一液（pH 1.2、日本薬局方・一般試験法 41）及び 0.2M リン酸 2 水素カリウム試液 250ml に 0.2N 水酸化ナトリウム試液 118ml 及び水を加えて 1000ml とした第二液（pH 6.8）を用いて崩壊性を試験することにより、確認することができる。第一液に 120 分間浸しても崩壊せず、

第二液中では60分間浸すと崩壊する錠剤または顆粒は、胃では溶解せず、十二指腸に流入して始めて崩壊し、有効成分が溶出されるものであり、腸溶性であると判断することができる。

本発明の組成物は、血中の脂質プロファイル改善する効果を發揮しうる。そのため、本発明の組成物は、高コレステロール血症、高中性脂肪血症、高低比重リポタンパク（LDL）コレステロール血症、低高比重リポタンパク（HDL）コレステロール血症の処置のために用いることができる。

また、本発明の組成物は、肥満、脂肪肝およびコレステロール胆石症を処置するためにも用いうる。

さらに、本発明の組成物は、ラクトフェリン等の有効成分がが食事性脂質の消化管吸収を阻害することにより、脂質代謝を改善すると考えられ、ひいては摂取エネルギーを減少させることによる減量効果を發揮しうる。したがって、肥満、並びに高脂血症、高血圧症およびII型糖尿病等の生活習慣病を処置するために有用である。

さらに、本発明の組成物は、基礎代謝量を向上させうる。例えば、起床時体温を上昇させ、および／または起床時体温と活動時の体温（例えば、起床後数時間後の体温、食事1時間後の体温）との差を増大させうる。基礎代謝量とは、目覚めている状態で生命を維持するために必要な最小限のエネルギー消費のことであるが、加齢とともに基礎代謝は下がりはじめ、ビタミン類、タンパク質が不足しているとき、気温の高いとき、睡眠中にも基礎代謝は下がる。同性・同年齢ならば、その体表面積に比例することが知られており、同じ体重なら体脂肪が多く、筋肉の割り合いの少ない者ほど基礎代謝は低い。したがって、肥満者は概して、そうでない者より基礎代謝量が劣っている。本発明の組成物は、肥満者等の基礎代謝の改善のためにも用いうる。

<製造例 3 (ラクトフェリン腸溶錠の製造)>

ラクトフェリン 5.5kg、乳糖 8kg、結晶セルロース 10kg、カルボキシメチルセルロース・カルシウム 1kg、グリセリン脂肪酸エステル 0.5kg を混合し、実施例 1 のように乾式で顆粒化した後、ラクトフェリンを 1 錠中に 50mg 含む直径 8mm、重量平均 250mg の錠剤に加圧成型した。この錠剤を、コーティング機に入れ、セラック 30 部、ヒマシ油 7 部をイソプロパノール 63 部に溶解した液を計算量だけ噴霧し、対錠剤重量比で 10%の腸溶性コーティングを施した錠剤を製造した。

<実施例 1>

5 週令の ICR 系雄性マウス 16 頭を無作為に 8 頭ずつの 2 群に分け、対照群をラット・マウス用標準飼料 (日本クレア製、CE-2) で飼育し、その他の群は CE-2 に 1%のラクトフェリン (ニュージーランド、タツア・ミルク・バイオロジクス社製、純度 84%) を添加して 4 週間飼育した。この間、3 日ごと測定した体重は、対照群と比べラクトフェリン群が若干上回る速度で増加したが、両群の間に有意差はなかった。また、4 週後の剖検時において秤量した肝臓、脾臓、脾臓、小腸、盲腸、内臓脂肪および副睾丸脂肪組織等の重量についても有意差はなかった。さらに、単位体重あたりの体長および腸の長さにも両群の間に有意差はなかった。

血中成分について測定したところ、ラクトフェリンの経口投与により、血中中性脂肪値は 20.8% ($P<0.05$) (図 1B)、血中遊離脂肪酸値は 27.9% ($P<0.05$)

<実施例 2>

42 歳の男性が、大量飲酒（ウイスキー500ml 程度）後、ラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）を、9 錠、3 分割で（すなわち、一日あたり 9 錠を均等に 3 分割して、起床時、昼食前および就寝前に）内服した。

- 5 飲酒後 2 日目には、中性脂肪値が正常域またはその近くにまで下がった。服用しなかった場合は、飲酒後 7 日目でも 200mg/dl を超えたままであった（図 5）。

<実施例 3>

- 10 総コレステロール値の高い 8 名が、それぞれ、ラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）を、一日あたり 9 錠、3 分割で、継続して内服した。

- 約 1 ヶ月には、8 名のうち総コレステロール値が正常値より高めであった 6 名では総コレステロール値が低下したが（ $P < 0.01$ in Student's t-test）、正常域にあった 2 名には総コレステロール値の変動は認められなかった（図 6）。このことからラクトフェリンはヒトにとって不要なコレステロールのみを低下させると
15 考察される。なお血液採取は定時（午前 11 時頃）に行った。

<実施例 4>

女性の健常者 12 名が、1 日 3 錠～9 錠のラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）を、約 1 ヶ月～2 ヶ月、継続して内服した。この間、特に食事・運動の指導は行わなかった。

- 20 ほとんどの者でウエスト（胴囲）の減少および体重の減少が診られた（図 7）。

<実施例 5>

37 歳の男性の飲酒家（毎日ビール大瓶 1 本、ウイスキーダブル 1 杯）が、ラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）を内服した。当初、9 錠、3 分割で内服したが、眠くて仕事ができず、2 日目から就寝前 3 錠に変更した。

- 25 8 日目に測定したところ、中性脂肪値は有意に低下していた。14 日目には総コレステロール値も減少した（図 8）。この男性は、のプラバスタチンを以前から服用

していたが、総コレステロール値が 210mg/dl まで低下したのは初めてであった。
この間、食生活に特に変化はなかった。なお血液採取は昼食前に行った。

<実施例 6>

- 5 中性脂肪値および総コレステロール値の高い 43 歳の女性が、ラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）を、1 日目および 2 日目は 9 錠、3 分割で、3 日目は 3 錠を就寝前に、4 日目以降は 6 錠を 3 錠ずつ起床時および就寝前に内服した。
- 12 日目には総コレステロール値が 231mg/dl に減少した（図 9）。また体重は 2kg 減少した。この間、食生活に特に変化はなかった。血液採取は午前 10 時～
- 10 11 時の間に行った。

<実施例 7>

- 41 歳の女性は、高トリグリセライド（TG）血症のため、リパンチルを数ヶ月服用していた。しかしながら、肝機能障害が出現したため、リパンチル服用を中止し、6 日間強力ミノファージンの静注を施行した。肝機能はおちついてきたが、
- 15 中性脂肪値は再度上昇し始めた。
- ラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）の服用（9 錠、3 分割）を開始したところ、当初 183mg/dl であった中性脂肪値が、翌日には 153mg/dl に低下した。またリパンチルを服用しないと 200mg/dl 以下にならなかった総コレステロール値が、
- 20 7 日目には 122 mg/dl に低下した（図 10）。この間、食生活に特に変化はなかった。血液採取は午前 9 時～10 時の間に行った。

<実施例 8>

- 特に肥満のない 65 歳の女性がラクトフェリン腸溶錠を内服した。
- 25 この女性は、総コレステロール値のみ 250mg/dl 以上という高値を示していたが、最近に加齢に伴い中性脂肪もやや高かった。プラバスタチンを服用することにより総コレステロール値は低下するが、足がつる等の副作用のため、服用できなかった。
- ラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）の服用（9 錠、3 分割）を開始したところ、

10 日目に総コレステロール値は 240mg/dl 台となった（図 11）。この間、食生活に変化はなかった。血液採取は午前 10 時～11 時の間に行った。

<実施例9>

- 5 42歳の男性の飲酒家（平均すると3から4日に1回、ウイスキーを200～300ml 程度）が、ラクトフェリン腸溶錠（製造例 3）を、1日あたり9錠、3分割して内服した。

1日に3回程度、採血して血中の中性脂肪値及び総コレステロール値を測定したところ、明らかな総コレステロール値の低下が認められ、また、中性脂肪値は、
 10 日間変動はあるが（食事により変動）、全体として減少する傾向が診られた（図 12）。なお、飲酒した翌朝の中性脂肪値（図12中では●で表されている。）は高いが、飲酒を中断した後は速やかに低下した。

<実施例 10>

- 15 ラクトフェリン腸溶錠を経口投与した場合の血中のラクトフェリン濃度を抗ウシラクトフェリン抗体を用いる ELISA 法により測定した。

[ELISA法によるラクトフェリン測定]

- 20 1. 96穴平底マイクロプレート（NUNC社製）に0.05M炭酸緩衝液（pH9.6）で500倍（ $2\mu\text{g/ml}$ ）に希釈した抗ウシラクトフェリン抗体（Goat, anti-bovine LF affinity purified, Bethyl Lab.社製）を $100\mu\text{l/well}$ 入れ、 4°C で一晩吸着させた。
2. プレートを0.05%Tween20・リン酸緩衝液（PBS）にて3回洗浄した。ブロッキング剤として、1.3%ゼラチン含有PBSを $300\mu\text{l}$ 入れ、室温で30分間インキュベートした。
- 25 3. プレートを0.05%Tween20-PBSにて3回洗浄し、0.05%Tween20、0.5M NaCl及び1%ウシ血清アルブミン（BSA）を含むPBS（以下、NB-PBS）にて希釈したスタンダードあるいはサンプルを $100\mu\text{l/well}$ 入れ、 4°C で8時間反応させた。
4. プレートを0.05%Tween20-PBSにて3回洗浄し、NB-PBSにて1,000倍に希

釈した抗ウシラクトフェリン抗体 (Rabbit, anti-bovine LF, IgG grade, ヤガイ社製) を $100\mu\text{l/well}$ 入れ、 4°C で 8 時間反応させた。

5. プレーートを 0.05% Tween20-PBS にて 3 回洗浄し、NB-PBS にて 5,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Goat, anti-rabbit IgG,

5 American Quail International 社製) を $100\mu\text{l/well}$ 入れ、 4°C で 8 時間反応させた。

6. プレーートを 0.05% Tween20-PBS にて 3 回洗浄した。さらに、基質溶液としてリン酸塩緩衝液に溶解した 2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt (1.18mM, 三光純薬社製) を $100\mu\text{l/well}$ 入れ、 37°C で 1 時間反応させた。

7. マイクロプレートリーダー (Sunrise Series, Type Classic, チカン社製) にて、波長 405nm の吸光度を測定し、スタンダードで作成した検量線によりラクトフェリン濃度を算出した。

15 体重 60kg の男性にラクトフェリン腸溶錠 (製造例 3) を 18 錠 ($900\text{mg} / 60\text{kg} = 15\text{mg/kg}$) 投与したところ、4hr 後および 8hr 後に採取した血液中には、ラクトフェリンが確認された (図 13A)。

ラクトフェリン腸溶錠の投与および血液採取は、次のスケジュールで行った。すなわち、7:00 に朝食を採った後、9:30 少し前にラクトフェリン投与前の血液採取し (Pre サンプル)、9:30 にラクトフェリン腸溶錠 (製造例 3) を投与した後、13:30 および 17:30 に血液採取した (それぞれ、4hr および 8hr サンプル) (図 13B)。

<実施例 11>

25 12 名からなるラクトフェリン腸溶錠 (製造例 3) 服用群と、31 名からなるコントロール群について、起床時体温と昼食 1 時間後の体温とを測定した。

ラクトフェリン服用群 (図 14A) はコントロール群 (図 14B) に比較し、起床時 ($P < 0.05$ in Student's unpaired t-test) および昼食 1 時間後 ($P < 0.01$ in Student's unpaired t-test) の体温はラクトフェリン服用群がいずれも有意に高

請 求 の 範 囲

1. (補正後) ラクトフェリンを有効成分とする、脂質代謝改善用組成物。
- 5 2. (補正後) ラクトフェリンを有効成分とする、高コレステロール血症、高中性脂肪血症、高低比重リポタンパクコレステロール血症、低高比重リポタンパクコレステロール血症、肥満、脂肪肝およびコレステロール胆石症からなる群より選択される少なくとも一つの疾患を処置するための組成物。
- 10 3. (補正後) ラクトフェリンを有効成分とする、基礎代謝量を増大させる組成物。
4. 請求項1～3のいずれ1項に記載された組成物であって：
有効成分および医薬として許容される添加剤を乾燥状態で混合し；- 15 所望により、混合物を乾燥状態で強圧成型し、次いで成型物を一定の大きさの微粒状物または顆粒とし；そして
所望により、混合物、微粒状物または顆粒を打錠するかもしくはカプセルに充填する
ことを含む工程により得られうる、粉末剤、散剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル
20 剤の形態である、前記組成物。

5. 腸溶性製剤の形態である、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

6. 有効成分を含む顆粒を打錠したものを、胃液に対しては抵抗性があり、小腸内で溶解する基剤を主成分とする皮膜でコーティングしてなる、請求項1～4の

5 いずれか1項に記載の組成物。

7. 有効成分を一日当たり約0.1mg～約50,000mg、好ましくは約0.5mg～約10,000mgを、最も好ましくは約10mg～約2,000mg投与するための、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

10

8. (補正後) 以下の工程を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物の製造方法：

有効成分および医薬として許容される添加剤を乾燥状態で混合し；

所望により混合物を乾燥状態で強圧成型し、次いで成型物を一定の大きさの微

15 粒状物または顆粒とし；そして

混合物、微粒状物または顆粒を打錠するかもしくはカプセルに充填する

ことを含む工程により得られうる、粉末剤、散剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル剤の形態である、前記製造方法。

20 9. (補正後) 脂質代謝改善用医薬の製造における、ラクトフェリンの有効成分としての使用。

10. (補正後) 高コレステロール血症、高中性脂肪血症、高低比重リポタンパクコレステロール血症、低高比重リポタンパクコレステロール血症、肥満、脂肪肝およびコレステロール胆石症からなる群より選択される少なくとも一つの疾患または状態を処置するための医薬の製造における、ラクトフェリン

25

の有効成分としての使用。

11. (補正後) 基礎代謝量の改善が有効とされる疾患又は状態を処置するための医薬の製造における、ラクトフェリンの有効成分としての使用。

5

12. 医薬が：

有効成分および医薬として許容される添加剤を乾燥状態で混合し；

所望により混合物を乾燥状態で強圧成型し、次いで成型物を一定の大きさの微粒状物または顆粒とし；そして

10 混合物、微粒状物または顆粒を打錠するかもしくはカプセルに充填することを含む工程により得られうる、粉末剤、散剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル剤の形態である、請求項9～11のいずれ1項に記載された使用。

15 13. 医薬が、腸溶性製剤の形態である、請求項9～12のいずれか1項に記載の使用。

14. 医薬が、有効成分を含む顆粒を打錠したものを、胃液に対しては抵抗性があり、小腸内で溶解する基剤を主成分とする皮膜でコーティングしてなる、請求項9～12のいずれか1項に記載の使用。

20

15. 医薬が、有効成分を一日当たり約0.1mg～約50,000mg、好ましくは約0.5mg～約10,000mgを、最も好ましくは約10mg～約2,000mg投与するための、請求項9～14のいずれか1項に記載の使用。

16. 医薬が、以下を含む工程により得られうる、粉末剤、散剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル剤の形態である、請求項9～15のいずれか1項に記載の使用：

有効成分および医薬として許容される添加剤を乾燥状態で混合し；

所望により混合物を乾燥状態で強圧成型し、次いで成型物を一定の大きさの微

5 粒状物または顆粒とし；そして

混合物、微粒状物または顆粒を打錠するもしくはカプセルに充填する。

17. (補正後) ラクトフェリンを有効成分として用いる、脂質代謝改善方法。

10 18. (補正後) ラクトフェリンを有効成分として用いる、高コレステロール血症、高中性脂肪血症、高低比重リポタンパクコレステロール血症、低高比重リポタンパクコレステロール血症、肥満、脂肪肝およびコレステロール胆石症からなる群より選択される少なくとも一つの疾患または状態の処置方法。

15 19. (補正後) ラクトフェリンを有効成分として用いる、使用基礎代謝量の改善が有効とされる疾患又は状態の処置方法。

20. 有効成分を、以下の工程により選られうる粉末剤、散剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル剤の形態で用いる、請求項17～19のいずれ1項に記載された方法：

20 有効成分および医薬として許容される添加剤を乾燥状態で混合し；